Journal of Water and Soil
Homepage: https://jsw.um.ac.ir

Research Article
Vol. 37, No. 5, Dec.-Jan., 2023, p. 685-700

Consequence of Natural and Long Term Oil Pollution on Microbial Population and Urease Activity of Soil

Sh. Moradi[1], M.R. Sarikhani[2*], A. Beheshti Ale-Agha[3], A. Reyhanitabar[4], S.S. Alavi-kia[5], A. Bandehagh[6], R. Sharifi[7]

1, 2 and 4- Ph.D. Student of Soil Biology and Biotechnology, Associate Professor and Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: rsarikhani@yahoo.com)
3- Associate Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran
5 and 6- Associate Professors, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
7- Assisstant Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

Received: 06-02-2023
Revised: 12-07-2023
Accepted: 26-07-2023
Available Online: 01-08-2023

How to cite this article:
Moradi, Sh., Sarikhani, M.R., Beheshti Ale-Agha, A., Reyhanitabar, A., Alavi-kia, S.S., Bandehagh, A., & Sharifi, R. (2023). Consequence of oil pollution on microbial population and urease sctivity of soil. *Journal of Water and Soil, 37*(5), 685-700. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jsw.2023.80896.1250

Introduction

Oil contamination affects the biological, physical, and chemical properties of soil. The abundance and diversity of soil microbial communities can significantly be influenced by petroleum hydrocarbons. Soil biological indicators including microbial population and enzyme activity, are highly sensitive to environmental stresses and respond to them quickly. Measuring the microbial population is one of the most common biological indicators which is used to study the quality and health of the soil. Also, measuring the activity of enzymes such as urease is one of the most sensitive indicators of oil-contaminated soils. There are some studies on the effects of oil contamination on microbial population and soil enzyme activity. Most of the studies have tested non-natural and short-term oil pollution and reported the adverse effects of oil hydrocarbons on microbial activities in soil. While the soil sample used in this research had natural and long-term contamination and the microorganisms are compatible with polluted conditions. The aim of this study was to investigate changes in the microbial population and urease activity in the presence of different levels of oil contamination, and how petroleum hydrocarbons can affect them. Petroleum hydrocarbons are toxic and persistent in soil, so it is necessary to study the pattern of changes in soil biological characteristics in effective soil management.

Material and Methods

In this study, 120 samples of oil-contaminated soils were collected from the oil-rich area of Naft-Shahr (located in the west of Kermanshah province) which had natural and long-term oil pollution. A nested design was used to analysis data in this research. The test factors included locations (4 locations) and 3 different levels of oil pollution: low (L), moderate (M), and high (H). Also, 10 replications were considered in the three levels of oil contamination. The collected soils were analyzed for physico-chemical (pH, EC, Θm, CCE, OC, soil texture) and biological

https://doi.org/10.22067/jsw.2023.80896.1250

properties (including urease activity, BR and SIR) using standard methods, and the concentration of oil pollutants was determined by the Soxhlet extractor. To determine the abundance of the culturable microbial population, bacterial counting was performed using nutrient agar (NA) and carbon-free minimal medium (CFMM) supplemented with crude oil as the media. Urease activity was measured by the indophenol blue method and finally, the results of measuring chemical, physical and biological properties were analyzed using principal component analysis (PCA).

Results and Discussion

The average percentage of oil measured by Soxhlet method was 4.03%, 9.95% and 22.50% respectively for L, M and H levels. The results showed that the microbial population increased with the increase of contamination intensity. The highest microbial population counted in NA culture medium was 9.54×10^5 CFU/g in H soils and the lowest population was 3.25×10^5 CFU/g in L soils. In the CFMM culture medium, the highest population in H soils was 11.3×10^5 CFU/g and the lowest population in L soils was 11.8×10^4 CFU/g. For both NA and CFMM mediums, location 1 had the highest population and location 4 had the lowest microbial population. Oil contamination of soil samples led to a decrease in urease activity in such a way that the highest enzyme activity in soils was obtained with low contamination (594.90 μgNH_4/g.h) and the lowest activity in heavily contaminated soils (176.11 μgNH_4/g.h). Also, the lowest urease activity was observed in location 1 and the highest in location 4. Principal components analysis (PCA) was also performed and 71% of the variance of the samples could be explained by the first two components (biochemical component and physical component). The results of this research indicated an increase in the microbial population with an increasing of the intensity of oil pollution. It seems that the results obtained from the studies conducted on man-made pollution and natural pollution have differences in terms of the type of biological responses. Aged, long-term and natural oil pollution has caused the selection of oil-resistant microbial community, and therefore we see their positive response to the presence of oil compounds. Conversely, urease enzyme activity was found to be higher in soils with low pollution. This suggests that microbial activity, while influential, is not the sole determinant of urease activity, and various factors contribute to Soil Enzyme Activity (SEA). The type of petroleum pollutant, the direct effect of petroleum compounds on urease-producing microorganisms, as well as the non-microbial origin of urease in soil can be possible reasons for reducing urease activity in contaminated soils.

Conclusion

In areas where petroleum pollutants are naturally and long-term present in the soil, some oil-decomposing microbial groups use petroleum hydrocarbons as a source of carbon for their nutrition, so the abundance of oil-decomposing communities increases. The results showed an increase in the microbial population with an increase in the intensity of oil pollution. On the other hand, the activity of urease enzyme measured in soils with low pollution was higher because non-microbial factors may affect the activity of this enzyme and the increase in the microbial population is not related to the increase in the population of urease-producing microbes.

Keywords: Biological indicators, Enzyme activity, Microbial population, Oil pollution

نشریه آب و خاک
https://jsw.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۳۷، شماره ۵، آذر-دی ۱۴۰۲، ص. ۷۰۰-۶۸۵

پیامد آلودگی نفتی طبیعی و طولانی‌مدت بر جمعیت میکروبی و فعالیت آنزیم اوره‌آز خاک

شکوفه مرادی[۱]- محمدرضا ساریخانی[۲*]- علی بهشتی آل آقا[۳]- عادل ریحانی تبار[۴]- سیدسیامک علوی کیا[۵]- علی بنده حق[۶]- روح اله شریفی[۷]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۰۴

چکیده

آلاینده‌های آلی از جمله ترکیبات نفتی، یک مشکل جهانی برای سلامت محیط‌زیست و موجودات زنده محسوب می‌شوند که می‌توانند ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک را تحت تأثیر قرار دهند. در این تحقیق، شاخص‌های زیستی از جمله جمعیت میکروبی و فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک‌های آلوده به نفت نفت–شهر کرمانشاه مورد توجه بود. به‌منظور بررسی اثرات آلودگی نفتی طولانی‌مدت و طبیعی، ۱۲۰ نمونه خاک آلوده با سطوح مختلف نفت؛ آلودگی شدید (H:High)، متوسط (M:Moderate) و کم (L: Low) از عمق ۱۵-۰ سانتی‌متری از ۴ منطقه مختلف تهیه‌شد. پس از اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک‌ها، شمارش میکروبی و اندازه‌گیری فعالیت اوره‌آز انجام‌شد. برای تعیین جمعیت میکروبی کل و باکتری‌های درگیر در تجزیه نفت، به‌ترتیب اقدام به شمارش میکروبی در محیط کشت‌های NA (Nutrient Agar) و CFMM (Carbon Free Minimal Medium) شد که رابطه مستقیمی با افزایش میزان نفت داشت. میانگین درصد نفت اندازه‌گیری شده به روش سوکسله، به‌ترتیب ۴/۰۳، ۹/۹۵ و ۲۲/۵۰ درصد به ترتیب برای سطوح L، M و H به‌دست آمد. نتایج نشان داد که با افزایش شدت آلودگی، جمعیت میکروبی افزایش یافت. بالاترین جمعیت میکروبی شمارش‌شده در محیط کشت NA، در خاک‌های با آلودگی شدید $9/54\times10^{5}$ CFU/g و پایین‌ترین جمعیت در خاک‌های با آلودگی کم $3/25\times10^{5}$ CFU/g به‌دست آمد. در محیط کشت CFMM نیز بیشترین و کمترین جمعیت به‌ترتیب در خاک‌های با آلودگی شدید و کم با مقادیر $3/11\times10^{5}$ CFU/g و $8/11\times10^{4}$ به‌دست آمد. میزان افزایش جمعیت میکروبی در دو محیط NA و CFMM با افزایش آلودگی به‌ترتیب ۲/۹ و ۳/۸ برابر بود. برای هردو محیط کشت، منطقه ۱ دارای بیشترین جمعیت و بیشترین درصد آلودگی نفتی و منطقه ۴ دارای کمترین جمعیت و کمترین درصد آلودگی نفتی بود. پایین‌ترین فعالیت اوره‌آز در منطقه ۱ و بالاترین آن در منطقه ۴ مشاهده شد. آلودگی نفتی نمونه‌های خاک منجر به کاهش فعالیت اوره‌آز شد به گونه‌ای که بیشترین فعالیت آنزیمی در خاک‌های با آلودگی کم ($594/90$ μgNH_4/g.h) و کمترین فعالیت در خاک‌های با آلودگی شدید ($176/11$ μgNH_4/g.h) به‌دست آمد، میزان درصد کاهش فعالیت با افزایش سطح آلودگی ۷۰/۵ درصد بود. آنالیز مؤلفه‌های اصلی نیز انجام شد و ۷۱ درصد از واریانس تراکمی نمونه‌ها توسط دو مؤلفه اول (مؤلفه بیوشیمیایی و مؤلفه فیزیکی) قابل توجیه بود. یافته‌های این تحقیق نشان داد که آلودگی نفتی طولانی‌مدت و طبیعی باعث گزینش جامعه میکروبی مقاوم به نفت شده و بنابراین پاسخ مثبت آنها به حضور ترکیبات نفتی را شاهد بودیم اما فعالیت آنزیم اوره‌آز تحت تأثیر آلودگی نفتی کاهش یافت. به‌نظر اثرات بازدارندگی ترکیبات نفتی بر فعالیت اوره‌از یا جامعه غالب میکروبی با فعالیت اوره‌از محدود، سبب شده است تا فعالیت اوره‌از واکنش منفی به حضور آلاینده نفتی نشان دهد.

واژه‌های کلیدی: آلاینده‌های نفتی، جمعیت میکروبی، شاخص‌های زیستی، فعالیت آنزیمی

۱، ۲ و ۴- به‌ترتیب دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشیار و استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: rsarikhani@yahoo.com)
۳- دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۵ و ۶- دانشیاران به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۷- استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

https://doi.org/10.22067/jsw.2023.80896.1250

مقدمه

آلودگی‌های نفتی، در نتیجه اکتشاف نفت، حمل و نقل، ذخیره‌سازی یا کاربرد آن و در پاره‌ای موارد به خاطر حوادث رخ می‌دهد که یک مشکل جهانی برای سلامت محیط‌زیست و موجودات زنده محسوب می‌شود. هیدروکربن‌های نفتی، آلاینده‌های آلی و پایدار هستند و می‌توانند به‌مدت طولانی در محیط آلوده باقی بمانند. برخی از آلودگی‌ها در محیط‌زیست به صورت طبیعی بوده و برخی از آنها ناشی از فعالیت-های انسانی است که در مورد مناطق نفتی و اکتشافات نفتی، رخداد چنین آلودگی اغلب به صورت طبیعی است. الگوی تغییر در ویژگی‌های خاک در نتیجه هر کدام از آلودگی‌های طبیعی یا انسانی متفاوت بوده (Liang *et al*., 2015) و نیاز به مطالعه بیشتری دارد. آلودگی نفتی، پیامدهای مختلفی بر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک دارد و در نهایت با به خطر انداختن سلامت و کیفیت خاک، تولید محصول را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (Liang *et al*., 2015). هیدروکربن‌های نفتی بر فراوانی و تنوع جمعیت میکروبی خاک اثر می‌گذارند و گروه خاصی از ریزجانداران که با چنین شرایطی سازگارند، قادر به استفاده و تجزیه ترکیبات نفتی می‌باشند (Phillips *et al*., 2009). برای بررسی اثرات یک آلاینده در خاک، شاخص‌های زیستی می‌توانند مورد استفاده قرارگیرند زیرا ریزجانداران خاک به تنش‌های اکوسیستم بسیار حساس هستند و از طریق تنظیم فعالیت، زیست‌توده و تنوع ساختار جامعه خود به سرعت به عوامل تنش‌زا پاسخ می‌دهند (Moreno *et al*., 2011). شاخص‌های انتخابی در پاسخ به آلاینده‌ها باید دارای ویژگی‌های زیر باشند: ۱- حساسیت به حضور آلاینده ۲- توانایی واکنش به سطوح مختلف آلودگی ۳- ثبات در نوع پاسخ افزایشی یا کاهشی در حضور آلاینده ۴- تمایز قائل شدن بین اثر آلاینده و اثر سایر عوامل مخرب (Trasar-Cepeda *et al*., 2000).

اگرچه از شمارش میکروبی نمی‌توان برای آنالیز زیست‌تخریب پذیری هیدروکربن‌ها استفاده کرد، اما تنوع و تعداد ریزجانداران در یک مکان معین می‌تواند به شناسایی آن منطقه باتوجه به اثر سمیت هیدروکربن‌ها روی جوامع میکروبی، سن و غلظت آلاینده کمک کند. علاوه براین جوامع میکروبی که مدت‌ها در معرض هیدروکربن‌های نفتی بوده‌اند، پتانسیل بالایی برای تجزیه زیستی نفت از خود نشان می‌دهند و همچنین قابل ذکر است که نشت تازه نفت در خاک اغلب بخش بزرگی از ریزجانداران را ازبین می‌برد در حالی که در خاک‌هایی با سطوح پایین‌تر آلودگی و به ویژه آلودگی‌های قدیمی‌تر، تعداد و تنوع میکروبی بالاتر است (Saadoun *et al*., 2008).

یکی از مهم‌ترین شاخص‌های زیستی در خاک‌های آلوده به نفت، فعالیت آنزیمی است. آنزیم‌های موجود در خاک از نظر منشأ می‌توانند به جامعه میکروبی زنده یا مرده خاک (از قبیل باکتری‌ها، قارچ‌ها) ریشه گیاهان یا جانوران خاک مربوط باشند. آنزیم‌ها، کاتالیزورهایی هستند که بدون اینکه دچار تغییر شوند، سرعت واکنش‌های بیوشیمیایی را افزایش می‌دهند و جزء لازم چرخه عناصر غذایی در خاک می‌باشند. فعالیت آنزیمی خاک متأثر از شرایط خاک و مدیریت‌های اعمال شده بر آن می‌باشد و می‌تواند به عنوان معیاری برای ارزیابی فعالیت میکروبی خاک، باروری خاک و اثرات بازدارنده آلاینده‌ها مورداستفاده قرارگیرد (Tabatabai, 1994). آنزیم‌ها به عنوان حسگرهای زیستی، بسیارحساس هستند، که برای تشخیص و اندازه‌گیری مقدار و غلظت آلاینده‌ها مورداستفاده هستند به گونه‌ای که هم برای تشخیص نشانه-های اولیه آلودگی مورداستفاده قرارمی‌گیرند و هم میزان حذف مؤثر آلاینده و به دست آوردن سلامت و کیفیت مجدد خاک را ارزیابی می-کنند (Rao *et al*., 2014). آنزیم اوره‌آز مسئول هیدرولیز کود اوره در خاک‌های کشاورزی می‌باشد و انجام این فرایند منجر به افزایش pH خاک می‌شود. این آنزیم دارای منشأ گیاهی، جانوری و میکروبی بوده و به صورت درون‌سلولی و برون‌سلولی یافت می‌شود (Tabatabai, 1994). با توجه به نوع پاسخ و نوسانات فعالیت اوره‌آز خاک به آلاینده‌ها از جمله آلاینده‌های نفتی، این موضوع باعث شده است که اندازه‌گیری این آنزیم، یک شاخص بیوشیمیایی حساس برای بررسی وضعیت خاک‌های آلوده به نفت باشد (Lee *et al*., 2008)، در حالی که پژوهشگران دیگر، سایر آنزیم‌ها را نیز به عنوان شاخص آلودگی خاک با هیدروکربن‌های نفتی مورد توجه قرارداده‌اند (Xu & Johnson, 1995) اما در مقایسه با سایر آنزیم‌های خاک، آنزیم اوره‌آز، نسبت به آلودگی خاک حساس‌تر است (Klamerus-Iwan *et al*., 2015؛ Gue *et al*., 2012).

لیائو و همکاران (Liao *et al*., 2015) تأثیر آلودگی نفتی بر جمعیت میکروبی را بررسی کردند و دریافتند که آلودگی نفتی اثر کاهشی بر جمعیت باکتری‌های هتروتروف و تأثیر فزاینده‌ای بر جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت دارد. بسیاری از محققان از جمله دوس سانتوس و همکاران (Dos Santos *et al*., 2011)؛ مارژسین و همکاران (Margesin *et al*., 2007) در گزارش‌های مختلف به نتایج مشابهی دست یافتند. نتایج به دست آمده از پژوهش‌های انجام شده در خاک‌های با آلودگی مصنوعی و خاک‌های با آلودگی طبیعی با هم قابل مقایسه نیستند و نوع پاسخ‌های زیستی به‌دست آمده در آنها نیز تفاوت هایی دارند. در این پژوهش منطقه‌ای که برای نمونه‌برداری انتخاب شد، منطقه نفت‌شهر واقع در غرب استان کرمانشاه بود که خاک‌های آن سال‌های زیادی تحت تأثیر آلاینده‌های نفتی بوده است. به گونه‌ای که کشف نفت در این مکان در سال ۱۲۸۰ هجری شمسی صورت گرفته است. در مناطقی که آلاینده‌های نفتی به طور طبیعی و بلندمدت

در خاک حضور دارند با گذشت زمان جوامع میکروبی خاک با شرایط آلودگی سازگار می‌شوند، بنابراین شاهد افزایش برخی فعالیت‌های میکروبی و همچنین فراوانی جمعیت میکروبی خواهیم‌بود. به عبارت دیگر برخی گروه‌های میکروبی که توانایی استفاده از نفت را دارند از هیدروکربن‌های نفتی به‌عنوان منبع کربن برای تغذیه خود بهره‌می گیرند در نتیجه فراوانی جوامع تجزیه کننده نفت افزایش می‌یابد (Sutton *et al*., 2013). با توجه به اثرات منفی آلاینده‌های نفتی بر جوامع میکروبی و فعالیت‌های آنزیمی آنها، در این پژوهش تأثیرات آلودگی نفتی طبیعی و درازمدت بر برخی شاخص‌های زیستی مورد توجه قرارگرفت.

در این مطالعه پراکنش جمعیت باکتریایی و فعالیت آنزیم اوره‌آز به عنوان شاخص‌های زیستی مهم در خاک‌های آلوده به نفت، در ۱۲۰ نمونه خاک جمع‌آوری‌شده از منطقه نفت شهر استان کرمانشاه، مورد بررسی قرارگرفت. هدف از این پژوهش بررسی چگونگی تغییرات جمعیت میکروبی در حضور آلودگی نفتی در خاک بود و همچنین با توجه به اهمیت آنزیم اوره‌آز در چرخه نیتروژن، فعالیت آنزیم اوره‌آز نیز مورد بررسی قرارگرفت. پاسخ به این سوالات که آیا حضور ترکیبات نفتی در خاک به صورت طبیعی و درازمدت موجب اختلال در فراوانی میکروبی و همچنین فعالیت اوره‌آزی در نمونه خاک‌های دارای غلظت های مختلف نفت خواهدشد یا نه؟ آیا تفاوتی بین مناطق نمونه‌برداری از نظر صفات مورد اندازه‌گیری وجود دارد؟ آیا روابطی بین جمعیت میکروبی و خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک دیده می‌شود؟ از اهداف این پژوهش به شمار می‌رود.

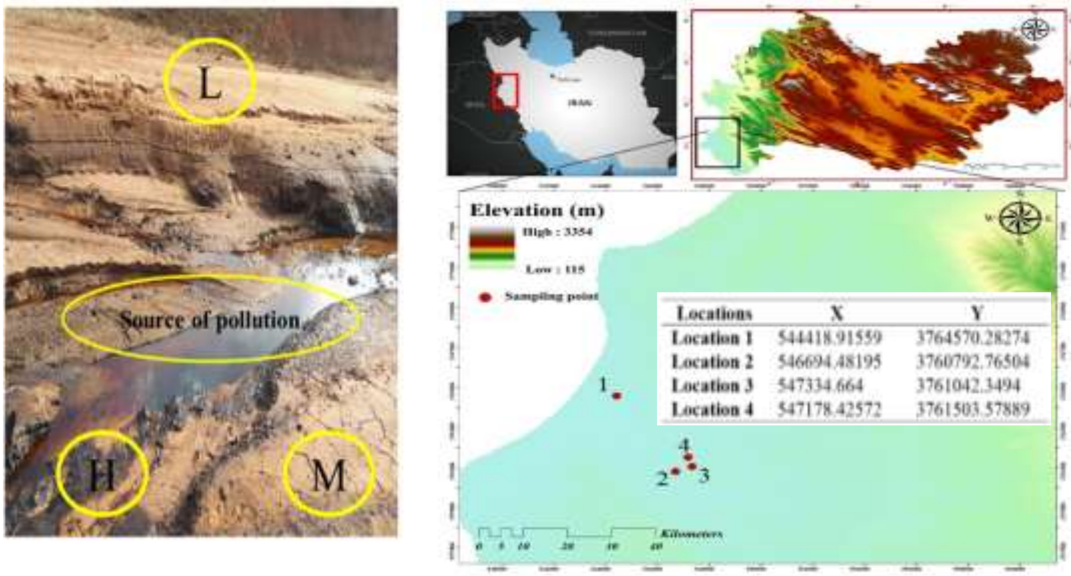
مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و آماده‌سازی خاک

نمونه‌برداری از خاک‌های آلوده به نفت برای این پژوهش از منطقه نفتخیز نفت‌شهر واقع در غرب استان کرمانشاه در آبان‌ماه ۱۳۹۹ انجام شد (شکل ۱). خاک‌های این منطقه مدت زیادی (بیش از ۱۵۰ سال) تحت تأثیر آلودگی نفتی طبیعی بوده‌اند. باتوجه به اینکه در این منطقه منابع طبیعی نفتی، میدان‌های نفتی و به ویژه سفره‌های زیرزمینی نفت وجود دارند، آلودگی نفتی در خاک‌های سراسر منطقه فراگیر شده‌بود. ۴ منطقه برای نمونه‌برداری گزینش و نمونه‌ها با توجه به نزدیکی و دوری از منبع آلودگی و سطوح غلظت آلاینده نفتی به‌صورت چشمی از بخش‌های سه‌گانه با سطح آلودگی شدید (H:High)، متوسط (M:Moderate) و کم (L: Low) گزینش شدند و تفکیک درست آنها پس از اندازه‌گیری غلظت آلاینده در آزمایشگاه انجام شد. قابل ذکر است که از نظر استاندارد، خاک‌های دارای آلودگی نفتی بیش از ۳ درصد، خاک‌های با آلودگی شدید محسوب می‌شوند. بنابراین طبق این استاندارد خاک‌های استفاده‌شده در این پژوهش خاک‌های با آلودگی شدید محسوب می‌شوند (Vincent *et al*., 2011) اما منطقه نمونه برداری به گونه‌ای بود که حتی خاک‌هایی که عاری از نفت به‌نظر می‌رسیدند نیز دارای درصدی از نفت بودند زیرا طی سالیان متمادی تحت تأثیر آلودگی نفتی قرارگرفته‌بودند. همچنین خاک دارای آلودگی صفر که بتوان به عنوان شاهد بدون آلودگی درنظر گرفت در آن وجود نداشت و لذا خاک‌های دارای آلودگی کم (Low) به‌عنوان شاهد برای مقایسه با خاک‌های دارای آلودگی متوسط و شدید مورد استفاده قرار گرفتند. از هر منطقه ۳۰ نمونه خاک برداشت‌شد که از این ۳۰ نمونه، ۱۰ نمونه خاک با آلودگی کم (L)، ۱۰ نمونه خاک با آلودگی متوسط (M) و ۱۰ نمونه خاک با آلودگی شدید (H) بود. در مجموع ۱۲۰ نمونه از لایه ۱۵-۰ سانتی‌متری برداشته‌شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شمارش جمعیت میکروبی

فراوانی جمعیت میکروبی قابل کشت، در محیط کشت‌های NA و CFMM شمارش شد. ترکیبات محیط کشت CFMM بر حسب گرم بر لیتر شامل (۳ NH_4NO_3، ۲/۲ Na_2HPO_4، ۰/۸ KH_2PO_4، ۰/۰۱ $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۰۵ $FeCl_3.6H_2O$، ۰/۰۰۵ $CaCl_2.2H_2O$ و pH=۷/۲) بود و در این محیط حداقل، به میزان ۱ درصد نفت خام افزوده شد. تنها منبع کربن در این محیط کشت، نفت بوده لذا کلنی‌های رشدیافته در آن معرف باکتری‌های تجزیه کننده نفت است، اما محیط کشت NA یک محیط عمومی برای رشد اکثر باکتری‌هاست. به دلیل آبگریز بودن و عدم اختلاط نفت با سایر اجزای محیط کشت جامد، پس از ریختن محیط کشت در پلیت و جامد شدن آن به میزان تقریبی۲۰۰ میکرولیتر از نفت خام بر سطح پلیت گسترده شد. برای شمارش و خالص‌سازی باکتری‌های بومی تجزیه‌کننده نفت سری‌های رقت تهیه شدند (10^{-5} تا 10^{-8}) و از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر به محیط جامد CFMM انتقال داده‌شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند (Ebrahimi *et al*., 2013). برای تهیه سری رقت‌ها ۱۰ گرم از هر نمونه خاک به ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه شیک شد و سپس سایر سری‌های رقت تهیه شدند و بدین ترتیب سوسپانسیون میکروبی جهت شمارش جمعیت میکروبی آماده شدند. فرض آزمایش بر این بوده است که دانسیته خاک ۱ گرم بر سانتی‌متر مکعب بوده است (Deaker *et al*., 2011). کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط‌کشت NA معرف کل باکتری‌های خاک و باکتری‌های رشدیافته بر روی محیط‌کشت CFMM تنها معرف باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت بود.



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی مناطق چهارگانه نمونه‌برداری و محل جمع‌آوری خاک‌های H، M و L در هر منطقه
بخش‌های سه گانه با سطح آلودگی شدید (H:High)، متوسط (M:Moderate) و کم (L: Low).

Figure 1– Geographical location of the four sampling locations and the collection site of H, M and L soils in each location
Three sections with severe pollution level High (H), Moderate (M) and low (L).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اوره‌آز

برای اندازه‌گیری فعالیت اوره‌آز از روش ایندوفنل-بلو[1] استفاده‌شد (Tabatabai, 1994). ۲/۵ گرم از نمونه خاک (مرطوب) را به درون لوله‌های آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر آب‌مقطر و ۱ میلی‌لیتر محلول اوره (۲۰۰ میلی‌مولار) ریخته و بعد از بهم زدن نمونه، برای فراهم ساختن دمای بهینه فعالیت آنزیم، لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرارگرفتند و به مدت ۲ ساعت در این شرایط نگهداری شدند. پس از انکوباسیون و خارج کردن نمونه‌ها از انکوباتور ۲۵ میلی‌لیتر KCl ۲ مولار به آنها اضافه شد و نیم ساعت شیک شده و سپس نمونه‌ها با استفاده از کاغذصافی، صاف شدند و از عصاره صاف‌شده، ۲۵ میلی‌لیتر برداشته و به آن ۲ میلی‌لیتر محلول فنل-سود و ۳ میلی‌لیتر هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ اضافه‌شد. مخلوط حاصل به مدت ۹۰ دقیقه به حال خود گذاشته‌شد تا تشکیل رنگ آبی تکمیل گردد. سپس مقدار جذب محلول های رنگی در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل SU-6100 قرائت شد. با رسم منحنی کالیبراسیون برای محلول-های استاندارد (تهیه شده از کلریدآمونیوم)، غلظت نمونه‌ها به دست آمد. محلول‌های مورداستفاده در این آزمایش (محلول فنل-سود و هیپوکلریت سدیم) بر اساس روش کار اندازه‌گیری فعالیت اوره‌آز به روش رنگ‌سنجی تهیه شد (Schinner, 2012).

اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی

برخی ویژگی‌های عمومی خاک همچون بافت، pH، قابلیت هدایت الکتریکی (EC)، درصد رطوبت خاک (Θm) و کربن آلی (OC) (Rowell, 1994)، کربنات کلسیم (CCE) (Martin and Reeve,1995) و تنفس پایه و برانگیخته (Schinner, 2012) با استفاده از روش‌کارهای استاندارد، پس از هواخشک کردن و عبوردادن از الک ۲ میلی‌متری، با در نظر گرفتن سه تکرار اندازه‌گیری شدند. برای تعیین غلظت آلاینده‌های نفتی (Oil %) در نمونه‌های خاک برداشته شده از سه سطح آلودگی شدید (H)، متوسط (M) و کم (L)، از دستگاه سوکسله استفاده و براساس روش UNEP/IOC/IAEA سازمان محیط زیست آمریکا انجام‌شد (Christopher *et al*., 1988). در این روش برای تعیین غلظت هیدروکربن‌های نفتی خاک، ابتدا ۱۰ گرم از نمونه خاک را روی کاغذ صافی ریخته سپس کاغذ صافی از هر طرف به‌طور کامل بسته و وزن اولیه یادداشت شد (W1) و سپس در دستگاه سوکسله قرارگرفت. برای استخراج مواد نفتی از ۴۰۰-۳۰۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان استفاده شد که تقریبا ۴ ساعت به طول انجامید، سپس ۷۲ ساعت در آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از تبخیر دی‌کلرومتان، وزن ثانویه (W2) یادداشت شد و در نهایت با استفاده از رابطه $B= 100 (W1-W2)/W2$ درصد نفت در هر نمونه خاک محاسبه شد (B درصد نفت، W1 وزن اولیه و W2 وزن ثانویه).

1- Indophenol Blue

تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی آشیانه‌ای (Nested) در سه تکرار انجام شد و داده‌ها از طریق نرم‌افزار آماری SPSS آنالیزشده و نمودارهای حاصله نیز از طریق نرم‌افزار Excel و SPSS ترسیم شدند. فاکتورهای درنظرگرفته‌شده در این پژوهش، ۴ منطقه نمونه‌برداری مختلف (Location 1، Location 2، Location 3 و Location 4) و ۳ سطح آلودگی (L، M و H) بود. ابتدا استانداردسازی داده‌ها انجام و داده‌های پرت حذف شدند. پیش از انجام هر آنالیز آماری ابتدا نرمال بودن داده‌های به‌دست آمده با استفاده از شاخص کلموگروف-اسمیرنوف (K-S) بررسی شد و برخی از ویژگی‌های اندازه‌گیری شده که دارای توزیع نرمال نبودند، با استفاده از روش تبدیل داده لگاریتمی نرمال شدند. به‌منظور بررسی تفاوت بین سطوح مختلف آلودگی (کم، متوسط و زیاد) و همچنین مناطق چهارگانه نمونه‌برداری از نظر تغییرات میزان ویژگی‌های اندازه‌گیری شده، تحلیل واریانس چندمتغیره و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ انجام شد. تحلیل همبستگی با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. به منظور بررسی میزان تأثیرگذاری ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و زیستی اندازه‌گیری‌شده بر تنوع نمونه‌های خاک، از تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) با به‌کارگیری نرم‌افزار آماری SPSS استفاده شد.

نتایج و بحث

ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی

میانگین ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی اندازه‌گیری‌شده در نمونه‌های خاک در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است. غلظت نفت در نمونه‌های خاک از ۴/۰۳ درصد در خاک‌های L تا ۲۲/۵ درصد در خاک‌های H متغیر بود (جدول ۱). با توجه به درصدهای نفت اندازه گیری شده در نمونه‌های خاک، به‌منظور تقسیم‌بندی ۱۲۰ نمونه خاک در سه گروه ۴۰ تایی (۴۰ نمونه L، ۴۰ نمونه M و ۴۰ نمونه H)، گروه بندی نمونه‌های خاک به‌صورت زیر انجام‌شد: ۰-۷/۱درصد نفت، خاک های L، ۷/۱۲-۱۲/۹۴ درصد نفت، خاک‌های M و درصد نفت بیشتر از ۱۲/۹۴ درصد برای خاک‌های H درنظر گرفته‌شد. بیشترین میزان رطوبت (۱۴/۲۴ درصد) در خاک‌های منطقه ۴ و کمترین مقدار آن مربوط به خاک‌های منطقه ۱ (۶/۹۱ درصد) بود (جدول ۲). درصد Θ_m در خاک‌های H (۱۵/۷۹ درصد)، با اختلاف معنی‌دار بالاتر از خاک‌های L (۵/۵۷ درصد) و خاک‌های M (۱۱/۸۴ درصد) بود (جدول ۱). تجزیه و تحلیل پارامترهای فیزیکوشیمیایی نشان داد که میانگین pH خاک از ۷/۰۵ در خاک‌های L تا ۷/۳۶ در خاک‌های H متغیر بود (جدول ۱). بالاترین pH در منطقه ۳ (۷/۴۴) و پایین‌ترین آن در منطقه ۴ (۷/۰۷) اندازه‌گیری شد (جدول ۲). همانطور که نتایج نشان می‌دهد، EC در نمونه‌های خاک با آلودگی نفتی متفاوت از ۱/۷۱ dS/m (خاک H) تا ۷/۵۹ dS/m (خاک L) متغیر بود. حداکثر مقدار EC در منطقه ۳ و حداقل مقدار آن در منطقه ۲ مشاهده شد (جدول ۲). محتوای کربن آلی (OC) در نمونه‌های خاک از ۵/۰۵ تا ۲۰/۸۴ درصد بسیار متغیر بود (جدول ۱). همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، درصد OC به طور قابل توجهی بین چهار منطقه مورد بررسی از ۸/۸۳ درصد در منطقه ۴ تا ۱۵/۹۶ درصد در منطقه ۱ متفاوت بود.

خاک‌های L دارای بالاترین درصد CCE (۹/۵۶ درصد) و خاک های H دارای پایین‌ترین درصد (۸/۷۴ درصد) بودند (جدول ۱). بیشترین میانگین درصد CCE در خاک‌های منطقه ۲ (۹/۹۱ درصد) و کمترین آن در خاک‌های منطقه ۱ (۸/۴۹ درصد) مشاهده شد. در ارزیابی بافت خاک‌های مورد بررسی، توزیع اندازه ذرات نشان داد که بین نمونه‌های خاک جمع‌آوری‌شده در شیب آلودگی نفتی (L، M و H) از نظر درصد شن و سیلت تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و تنها درصد رس تفاوت معنی‌داری نشان داد (جدول ۱). درصد رس در خاک‌های L، (۲۳/۶۷ درصد) به‌طور معنی‌داری از خاک‌های H (۲۰/۷۹ درصد) بیشتر بود (جدول ۱).

تنفس پایه (BR) اندازه‌گیری‌شده نشان داد که منطقه ۳ با ۰/۰۵۲ mgCO$_2$/g.h، بیشترین و منطقه ۲ با ۰/۰۳۰ mgCO$_2$/g.h، کمترین مقادیر را به خود اختصاص دادند (جدول ۱) و همچنین چهار منطقه مختلف با هم اختلاف آماری معنی‌داری نشان دادند (P<۰/۰۱) و در کلاس‌های آماری مختلف قرار گرفتند (جدول ۲). همچنین همبستگی مثبت و معنی‌داری بین تنفس پایه خاک و شمار جمعیت میکروبی رشدیافته در محیط کشت عمومی NA (r= ۰/۶۸۴، P< ۰/۰۱) و محیط کشت حاوی ترکیبات نفتی CFMM (r= ۰/۵۰۲، P< ۰/۰۱) مشاهده شد (جدول ۵). بالاترین میزان تنفس برانگیخته (SIR) نیز همانند تنفس پایه، متعلق به خاک‌های H بود. میزان تنفس برانگیخته، در خاک‌های با آلودگی زیاد (H)، متوسط (M) و کم (L) به‌ترتیب ۰/۲۳۴، ۰/۲۰۵ و ۰/۱۴۲ mgCO$_2$/g.h بود. میانگین SIR اندازه‌گیری‌شده در هرسه غلظت آلاینده نفتی اختلاف آماری معنی‌داری (P<۰/۰۱) نشان‌دادند (جدول ۱). مناطق ۱ و ۲ از نظر میزان SIR در یک کلاس آماری قرار گرفتند و بیشترین مقدار مربوط به منطقه ۱ (۰/۲۱۰ mgCO$_2$/g.h) بود و منطقه ۳ با ۰/۱۸۴ mgCO$_2$/g.h، پایین‌ترین مقدار را به خود اختصاص داد اما به لحاظ آماری با منطقه ۴ اختلاف قابل توجهی نداشت (جدول ۲). نتایج به‌دست آمده نشان داد که SIR اندازه‌گیری شده با جمعیت میکروبی شمارش شده در محیط کشت عمومی NA (r= ۰/۷۷۴، P< ۰/۰۱) و همچنین با جمعیت میکروبی شمارش شده در محیط کشت CFMM نیز همبستگی مثبت و معنادار (r= ۰/۸۴۵، P< ۰/۰۱) وجود دارد (جدول ۵). در پژوهش حاضر نمونه خاک‌های مورد بررسی سال‌های زیادی تحت تأثیر آلاینده نفتی بوده‌اند و به‌عبارتی می‌توان گفت سازگاری لازم بین جوامع میکروبی و آلاینده نفتی ایجاد شده‌است. نتایج آزمایش

مربوطه در این پژوهش نشان داد که میزان CO_2 متصاعدشده ناشی از فعالیت تنفسی ریزجانداران (تنفس پایه و برانگیخته)، در حضور ماده نفتی بیشتر بود. همبستگی بالای بین تنفس پایه و میزان درصد نفت (r= ۰/۷۶۶ و P<۰/۰۱) و همچنین همبستگی مثبت و معنی‌دار تنفس برانگیخته و درصد نفت (r= ۰/۸۴۷ و P<۰/۰۱) گواهی بر این ادعاست (جدول ۵).

جمعیت میکروبی

نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان داد که جمعیت میکروبی شمارش شده در دو محیط کشت NA و CFMM، متفاوت بودند و مشاهده شد که فراوانی میکروبی در محیط کشت NA بیشتر از محیط کشت CFMM بود (جدول ۳). از آنجا که محیط کشت NA یک محیط کشت عمومی برای رشد اکثر باکتری‌هاست، تعداد میکروب شمارش شده در آن بیشتر است اما محیط کشت CFMM محیط کشتی با حداقل عناصر غذایی است و تنها منبع کربن برای ریزجانداران خاک، کربن موجود در نفت افزوده شده در آن است و طبیعی است که شمار میکروبی کمتری در آن به‌دست آید زیرا باتوجه به تفاوت ذکر شده، تنها جوامع میکروبی با قابلیت تجزیه هیدروکربن‌های نفتی می‌توانند در آن رشد کنند. نتایج مطالعه ما نشان داد که جمعیت میکروبی در خاک‌های دارای آلودگی شدید بیشتر بود. تعداد کلنی‌های شمارش‌شده در خاک های با آلودگی شدید (H) با اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۱) بالاتر از خاک‌های دارای غلظت متوسط (M) و غلظت پایین نفت (L) بود (جدول ۳).

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی به دست آمده از نمونه‌های خاک با سه سطح آلودگی شدید (High)، متوسط (Moderate) و کم (Low)

Table 1- Some physicochemical and biological characteristics obtained from soil samples with three levels of high, moderate and low pollution

غلظت آلاینده نفتی Oil concentration	رطوبت Moisture Θ_m (%)	pH	هدایت الکتریکی EC (dS/m)	کربن آلی OC (%)	کربنات-کلسیم معادل CCE (%)	شن Sand (%)	سیلت Silt (%)	رس Clay (%)	غلظت نفت Oil (%)	تنفس پایه BR ($mgCO_2$/g.h)	تنفس برانگیخته SIR ($mgCO_2$/g.h)
کم Low	5.57^{c}	7.05^{c}	7.59^{a}	5.05^{c}	9.56^{a}	44.96^{a}	28.67^{a}	23.67^{a}	4.03^{c}	0.023^{c}	0.142^{c}
متوسط Moderate	11.84^{b}	7.26^{b}	3.24^{b}	12.31^{b}	9.09^{b}	44.22^{a}	30.17^{a}	24.30^{a}	9.95^{b}	0.041^{b}	0.205^{b}
شدید High	15.79^{a}	7.36^{a}	1.71^{c}	20.84^{a}	8.74^{b}	49.35^{a}	28.2^{a}	20.79^{b}	22.5^{a}	0.053^{a}	0.234^{a}

درصد نفت (Oil)، تنفس پایه (Basal Respiration:BR)، تنفس برانگیخته (Substrate Induced Respiration:SIR)، درصد شن (Sand)، درصد رس (Clay)، درصد سیلت (Silt)، درصد کربنات کلسیم معادل (Carbonate Calcium Equivalent:CCE)، درصد کربن آلی (Organic Carbon:OC).

جدول ۲- برخی خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی نمونه‌های خاک در چهار منطقه نمونه‌برداری

Table 2– Some physicochemical and biological characteristics of soil samples in four sampling locations

مناطق نمونه برداری Sampling locations	رطوبت Moisture Θ_m (%)	pH	هدایت الکتریکی EC (dS/m)	کربن آلی OC (%)	کربنات کلسیم معادل CCE (%)	شن Sand (%)	سیلت Silt (%)	رس Clay (%)	غلظت نفت Oil (%)	تنفس پایه BR ($mgCO_2$/g.h)	تنفس برانگیخته SIR ($mgCO_2$/g.h)
منطقه ۱ Location 1	6.91^{c}	7.22^{b}	2.94^{b}	15.96^{a}	8.49^{c}	59.45a	21.44^{c}	17.73^{b}	15.95^{a}	0.042^{b}	0.210^{a}
منطقه ۲ Location 2	10.31^{b}	7.20^{b}	2.67^{b}	14.63^{a}	9.91^{a}	48.69^{b}	30.29^{b}	16.32^{b}	12.62^{b}	0.030^{d}	0.200^{a}
منطقه ۳ Location 3	13.01^{ab}	7.44^{a}	5.43^{a}	12.57^{b}	9.44^{b}	43.92^{b}	27.02^{bc}	27.43^{a}	12.37^{b}	0.052^{a}	0.184^{b}
منطقه ۴ Location 4	14.24^{a}	7.07^{c}	5.31^{a}	8.83^{c}	8.69^{c}	33.31^{c}	37.01^{a}	29.68^{a}	8.78^{c}	0.034^{c}	0.186^{b}

درصد نفت (Oil)، تنفس پایه (Basal Respiration:BR)، تنفس برانگیخته (Substrate Induced Respiration:SIR)، درصد شن (Sand)، درصد رس (Clay)، درصد سیلت (Silt)، درصد کربنات کلسیم معادل (Carbonate Calcium Equivalent:CCE)، درصد کربن آلی (Organic Carbon:OC).

جدول ۳- جمعیت میکروبی شمارش شده (CFU/g) در محیط کشت‌های NA و CFMM در ٤ منطقه نمونه‌برداری و در سطوح مختلف آلودگی نفتی (Low، Moderate و High)

Table 3- Microbial population counted in NA and CFMM mediums in 4 sampling locations and at different levels of oil pollution (Low, Moderate and High)

مناطق نمونه‌برداری Sampling locations	محیط‌کشت Medium	غلظت آلاینده نفتی Oil concentration			
		کم Low	متوسط Medium	شدید High	میانگین Mean
منطقه ۱ Location 1	NA	$5.06×10^{5\ d}$	$1.13×10^{6a}$	$1.12×10^{6\ a}$	$9.37×10^{5\ A}$
منطقه ۲ Location 2		$3.55×10^{5\ e}$	$8.40×10^{5bc}$	$9.46×10^{5\ ab}$	$7.22×10^{5\ B}$
منطقه ۳ Location 3		$2.85×10^{5\ e}$	$7.07×10^{5c}$	$8.12×10^{5\ bc}$	$6.25×10^{5\ C}$
منطقه ۴ Location 4		$1.60×10^{5\ f}$	$3.67×10^{5e}$	$6.98×10^{5\ c}$	$3.31×10^{5\ D}$
میانگین Mean		$3.28×10^{5\ C}$	$6.48×10^{5B}$	$9.54×10^{5\ A}$	
منطقه ۱ Location 1	CFMM	$6.06×10^{4\ f}$	$2.93×10^{5\ bc}$	$4.54×10^{5\ bc}$	$2.98×10^{5\ A}$
منطقه ۲ Location 2		$1.81×10^{5\ d}$	$6.61×10^{5\ a}$	$2.52×10^{5\ c}$	$3.34×10^{5\ A}$
منطقه ۳ Location 3		$5.62×10^{4\ f}$	$1.05×10^{5\ e}$	$1.93×10^{5\ cd}$	$1.26×10^{5\ B}$
منطقه ۴ Location 4		$2.97×10^{4\ g}$	$1.42×10^{5\ de}$	$2.97×10^{5\ bc}$	$1.20×10^{5\ C}$
میانگین Mean		$8.11×10^{4\ C}$	$2.53×10^{5\ B}$	$3.11×10^{5\ A}$	

جمعیت کل ریزجانداران خاک در اثر تنش‌های غیرزیستی نظیر آلاینده‌های نفتی و فقر غذایی، کاهش می‌یابند اما باکتری‌های تجزیه کننده نفت دچار تغییر نمی‌شوند. به عبارت دیگر آلودگی نفتی، موجب ایجاد شرایط انتخابی در خاک می‌شود به گونه‌ای که تنها ریزجاندارانی که قادر به استفاده از هیدروکربن‌های نفتی هستند از فراوانی بالاتری برخوردار باشند. در گزارشی (Liao *et al*., 2015) تأثیرات آلودگی نفتی بر ساختار و فعالیت میکروبی و عملکرد متابولیسم کربن توسط ریزجانداران را مورد مطالعه قرار دادند و بیان کردند که آلودگی نفتی طولانی‌مدت، به شدت ساختار و الگوی جامعه میکروبی خاک را تغییر داده و تغییرات میکروبی به لحاظ فراوانی، غنای باکتریایی، تنوع زیستی باکتریایی و عملکرد آنها به لحاظ آماری معنی‌دار بود. آنها دریافتند که بالا بودن فراوانی و تنوع میکروبی، رشد ریزجانداران هتروتروف که قابلیت تخریب هیدروکربن‌ها و استفاده از منابع غنی نفتی را دارند افزایش داده‌است. در تحقیقی که بر روی متاژنوم خاک‌های متأثر از آلودگی نفتی انجام شد (Dos Santos *et al*., 2011) مشاهده کردند که در خاک‌های آلوده به نفت، تعداد OTU[1]ها به طور قابل‌توجهی افزایش یافت. نتایج پژوهش آنها گویای این مطلب بود که برخی از گونه‌های تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی در محیط آلوده به نفت، به دلیل انتخاب طبیعی غالب شده‌اند. محققان زیادی با بررسی تاثیرات آلاینده‌های نفتی بر جمعیت و فعالیت میکروبی نتایج مشابهی به دست آوردند (Margesin *et al*., 2007 ؛Hui *et al*., 2007).

فعالیت آنزیم اوره‌آز

نتایج اندازه‌گیری فعالیت اوره‌آز حاکی از کاهش فعالیت این آنزیم در خاک‌های آلوده به نفت در مقایسه با خاک‌های دارای آلودگی کم بود. بالاترین فعالیت اوره‌آزی در خاک‌های L (۵۹۴/۹۰ μgNH₄/g.h) و پایین‌ترین میزان فعالیت در خاک‌های H (۱۷۶/۱۱ μgNH₄/g.h) به‌دست آمد (جدول ۴). در مقایسه ۴ منطقه مختلف نمونه‌برداری مشاهده شد که منطقه ۴ با ۵۹۲/۳۶ μgNH₄/g.h بیشترین و منطقه ۱ با ۲۴۲/۳۶μgNH₄/g.h کمترین فعالیت اوره‌آزی را به خود اختصاص

1- Operational Taxonomic Unit

دادند (جدول ۴). در بخش اندازه‌گیری غلظت نفت نمونه خاک‌ها مشاهده شد که بالاترین درصد نفت به‌دست‌آمده متعلق به منطقه ۱ بود (جدول ۱) که پایین‌ترین میزان فعالیت اوره‌آزی را داشت.

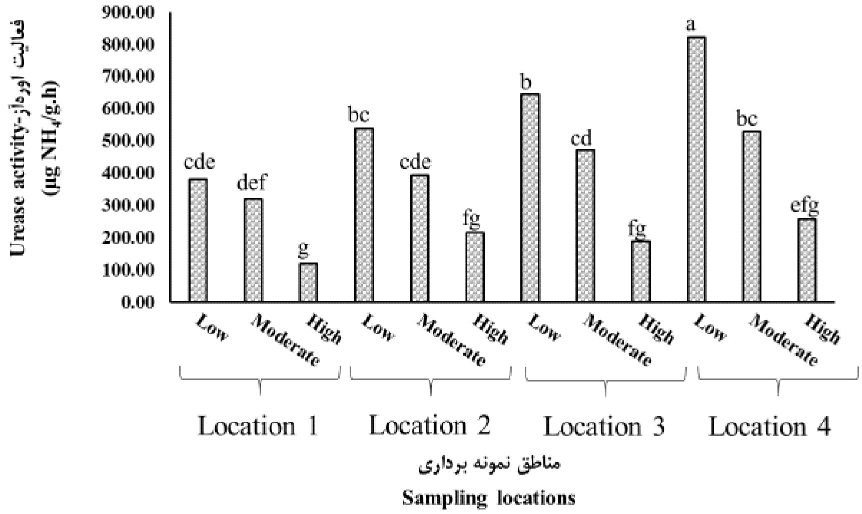
همچنین اثرات متقابل غلظت آلودگی نفتی (Low، Moderate و High) و مناطق ۴ گانه نمونه‌برداری نشان داد که در همه مناطق خاک‌های L بالاترین و خاک‌های H پایین‌ترین فعالیت آنزیم اوره‌آزی را داشتند (شکل ۲). آنزیم اوره‌از در خاک می‌تواند منشأ گیاهی، حیوانی و میکروبی داشته‌باشد (Andreoni *et al*., 2004). لذا فعالیت اوره‌آز در مناطقی که دارای پوشش گیاهی کم و یا فاقد پوشش گیاهی هستند کمتر است. نتایج آزمایش ما نشان داد که بین فعالیت اوره‌آز اندازه‌گیری شده و جمعیت میکروبی شمارش‌شده در هردو محیط کشت NA و CFMM با تنفس میکروبی پایه (BR) و برانگیخته (SIR)، همبستگی منفی معنی‌داری وجود دارد. این مطلب به وضوح نشان می‌دهد که فعالیت این آنزیم در این خاک‌ها تنها تحت تأثیر جوامع میکروبی خاک نیست و عوامل دیگری ممکن است نقش داشته‌باشند. هرچند در این آزمایش گونه‌های میکروبی رشد یافته در محیط CFMM جهت بررسی فعالیت اوره‌آزی مورد آزمون قرار نگرفتند اما به‌نظر می‌رسد که ریزجانداران غالب در حضور ترکیبات نفتی دارای فعالیت اوره‌آزی محدودی بوده و همین موضوع در نتایج این تحقیق نیز انعکاس یافته است. در مطالعه‌ای که با هدف جداسازی باکتری‌های اندوفیت محرک رشد گیاه از ریشه ذرت (Moradi *et al*., 2019) انجام شد، نتایج بررسی فعالیت اوره‌آزی جدایه‌های میکروبی نشان داد که تنها ۶/۶ درصد آنها اوره‌آز مثبت بودند.

فعالیت اوره‌آز نسبت به سایر آنزیم‌های خاک، به آلودگی خاک حساس‌تر است و همچنین به‌عنوان حساس‌ترین شاخص بیوشیمیایی به‌منظور ارزیابی خاک‌های آلوده به نفت مورد توجه قرارگرفته‌است (Guo *et al*., 2012؛ Klamerus- Iwan *et al*., 2015؛ Lee *et al*., 2008). بنابراین مهار فعالیت اوره‌آز ممکن است نتیجه تأثیر مستقیم هیدروکربن‌های نفتی بر روی ریزجانداران تولیدکننده این آنزیم و یا یک نتیجه غیرمستقیم از خواص فیزیکی خاک باشد (Klamerus-Iwan *et al*., 2015). به‌عبارت دیگر این اثر منفی هیدروکربن‌های نفتی ممکن است به‌دلیل سرکوب یا کاهش جمعیت ریزجانداران درگیر در هیدرولیز اوره در خاک باشد زیرا هیدروکربن‌ها ممکن است سطوح آلی، معدنی و سلولی را بپوشانند و مانع از فعالیت آنزیم شوند (Guo *et al*, 2012؛ Labud *et al*., 2007). در پژوهش‌های زیادی نتایج مشابهی گزارش شده‌است و نتایج آنها بیانگر این است که آلودگی نفتی اثرات منفی بر فعالیت اوره‌آز خاک دارد (Labud *et al*., 2007؛ Lipińska *et al*., 2012؛ Klamerus-Iwan *et al*., 2015؛ Guo *et al*., 2012؛ Gianfreda *et al*., 2005؛ Wyszkowska *et al*., 2006).

جدول ٤- میانگین فعالیت آنزیم اوره‌آز در ٤ مکان نمونه‌برداری و سطوح مختلف آلودگی نفتی

Table 4- Average activity of urease in 4 sampling locations and different levels of oil pollution

مناطق نمونه‌برداری **Sampling locations**	فعالیت اوره‌آز (µgNH₄/g.h) **Urease activity**
منطقه ۱ Location 1	242.05[c]
منطقه ۲ Location 2	368.80[b]
منطقه ۳ Location 3	407.36[b]
منطقه ۴ Location 4	592.36[a]
غلظت آلاینده نفتی Oil concentration	
کم Low	594.90[A]
متوسط Moderate	459.59[B]
شدید High	176.11[C]



شکل ۲- اثر متقابل مکان نمونه‌برداری و سطوح آلودگی نفتی بر فعالیت آنزیم اوره‌آز
Figure 2- Interaction of sampling location and oil pollution levels on urease enzyme activity

فعالیت اوره‌آز توسط عوامل مختلفی از جمله نوع آلاینده، مدت انکوباسیون خاک، pH، محتوای کربن آلی و تعداد حلقه‌های بنزن در هیدروکربن‌های نفتی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Lipińska *et al.*, 2012). نوع آلاینده عامل بسیار مهمی در فعالیت اوره‌آز است. برخی محققان علی‌رغم نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، افزایش فعالیت اوره‌آز را با افزایش غلظت نفت گزارش کرده‌اند. به‌عبارت دیگر سازگاری ریزجانداران خاک با آلودگی نفتی که طی مدت زیادی در خاک بوده است، منجر به انتخاب طبیعی و افزایش جمعیت میکروبی منتخب و استفاده از نفت به‌عنوان منبع کربن و انرژی شده‌است. بنابراین این افزایش جمعیت میکروبی ممکن است افزایش فعالیت اوره‌آز را نیز به دنبال داشته باشد. این نکته قابل ذکر است که افزایش جمعیت در نتیجه تطابق با شرایط آلودگی خاک، کل جمعیت میکروبی را شامل می‌شود در حالی‌که تنها بخشی از جوامع میکروبی فعالیت اوره‌آز دارند (Lipińska *et al.*, 2012). به‌نظر می‌رسد گرچه سازگاری جمعیت میکروبی در حضور آلاینده نفتی رخ داده است ولیکن جمعیت غالب از گونه‌های میکروبی غیرمولد اوره‌آز باشند، یا شاید ترکیبات نفتی به‌عنوان بازدارنده، اثر کاهشی بر فعالیت این آنزیم داشته‌اند. همچنین بسته به جرم مولکولی ترکیبات نفتی، فعالیت آنزیمی ممکن است مهار یا تحریک شود. ترکیباتی که ۲، ۳ یا ۴ حلقه بنزن دارند، به راحتی در دسترس ریزجانداران قرار می‌گیرند که موجب افزایش فعالیت آنها می‌شود (Lipińska *et al.*, 2012). گائو و همکاران (Guo *et al.*, 2012) تأثیرات آلودگی نفتی را بر فعالیت آنزیم اوره‌آز مورد بررسی قرار دادند. آنها به وضوح اثر منفی افزایش غلظت نفت را بر فعالیت اوره‌آز نشان دادند و گزارش کردند که حساس‌ترین شاخص زیستی به آلودگی نفت دیزل، آنزیم اوره‌آز است. همچنین در تحقیقی (Lipińska *et al.*, 2012) فعالیت اوره‌آز خاک‌های آلوده به PAH را مورد مطالعه قرار دادند که مشاهده کردند حضور PAHها موجب کاهش فعالیت اوره‌آز شده و افزایش غلظت این آلاینده‌ها در خاک، به دلیل نقش بازدارندگی، فعالیت اوره‌آز را کاهش داد.

تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA)

در تحلیل مؤلفه‌های اصلی در این پژوهش، مقادیر ویژه بزرگ‌تر از ۱ درنظر گرفته شد و دو مؤلفه اول دارای مقدار ویژه بالاتر از ۱ بودند (شکل ۳) و نتایج تجزیه PCA نشان داد که ۷۱ درصد از واریانس تراکمی توسط دو مؤلفه اول (F_1 و F_2) قابل توجیه بود (شکل ۳ و جدول ۶). آنالیز PCA یک روش برای تجزیه و تحلیل داده‌های آماری چند متغیره است که در آن مجموعه‌ای از داده‌های خام به تعدادی از مؤلفه‌های اصلی (PCA) کاهش می‌یابد و بیشتر واریانس را در داده‌های اصلی حفظ می‌کند تا الگوها یا خوشه‌های احتمالی بین تیمارها و متغیرها را شناسایی کند (Cox *et al.*, 2003).

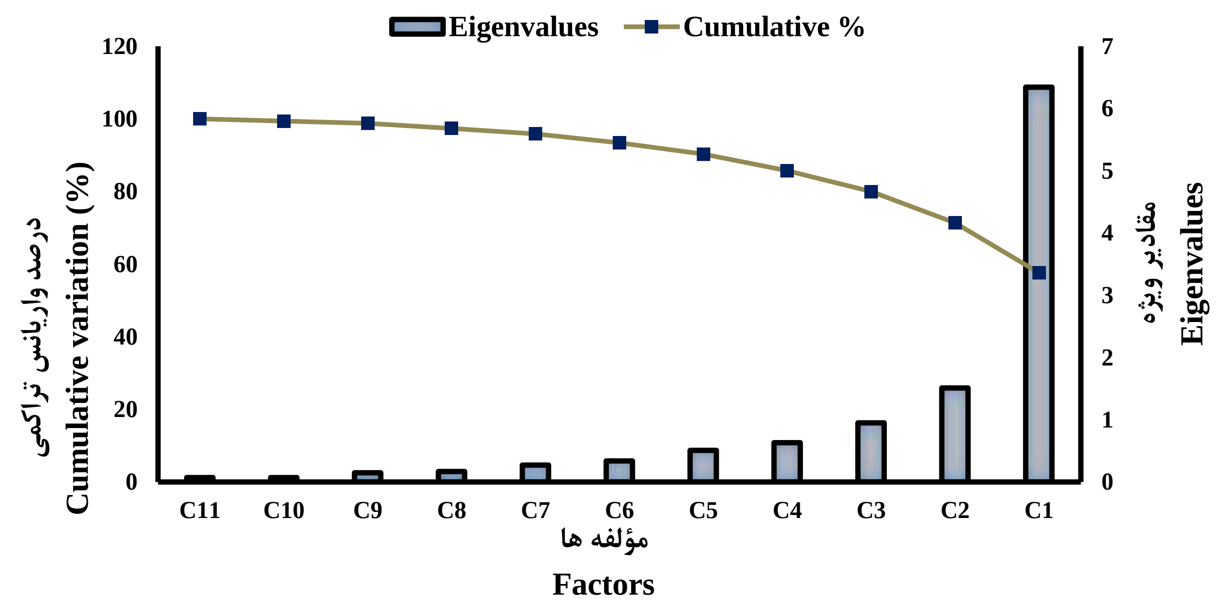
تحلیل PCA انجام شده در این پژوهش نشان داد که واریانس کل نمونه‌های خاک توسط ۱۱ مؤلفه به‌دست آمده قابل توجیه است به گونه‌ای که مؤلفه اول (F_1) به تنهایی ۵۷/۶۳ درصد از واریانس کل را توجیه‌کرد (جدول ۶). درصد واریانس تراکمی دو مؤلفه اول ۷۱/۳۲ درصد بود و به همین ترتیب برای سایر مؤلفه‌ها نیز در همین جدول قابل مشاهده است.

جدول ۵- ضرایب همبستگی بین شاخص‌های فیزیکوشیمیایی و زیستی اندازه‌گیری شده در نمونه‌های خاک

Table 5- Correlation coefficients between physicochemical and biological indicators measured in soil samples

	غلظت نفت Oil	محیط NA	محیط CFMM	تنفس پایه BR	تنفس برانگیخته SIR	فعالیت اوره‌آز UA	شن %Sand	رس %Clay	سیلت %Silt	کربنات-کلسیم معادل CCE	pH	قابلیت هدایت الکتریکی EC	کربن آلی OC
Oil	1												
NA	0.766	1											
CFMM	0.707**	0.829**	1										
BR	0.766**	0.684**	0.502**	1									
SIR	0.847**	0.774**	0.845**	0.667**	1								
UA	-0.697**	-0.756**	-0.622**	-0.549**	0.562**	1							
Sand	0.041	0.223*	0.124	-0.072	0.104	-0.131	1						
Clay	-0.127	-0.370**	-0.441**	0.163	-0.230*	0.299**	-0.644**	1					
Silt	0.009	-0.146	-0.027	0.013	-0.023	0.094	-0.875**	0.370**	1				
CCE	-0.361**	-0.158	-0.093	-0.257**	-0.254**	0.186*	-0.004	-0.070	0.025	1			
pH	0.418**	0.478**	0.371**	0.615**	0.350**	-0.441**	0.016	-0.032	-0.073	0.150	1		
EC	-0.769**	-0.728**	-0.664	-0.552**	-0.702**	0.718**	-0.167	0.291**	0.097	0.160	-0.502**	1	
OC	0.853	0.750**	0.660	0.611**	0.731**	-0.685**	0.153	-0.265**	-0.067	-0.299**	0.374**	-0.740**	1

درصد نفت (Oil)، تنفس پایه (Basal Respiration:BR)، تنفس برانگیخته (Substrate Induced Respiration:SIR)، درصد شن (Sand)، درصد رس (Clay)، درصد سیلت (Silt)، درصد کربنات کلسیم معادل (Carbonate Calcium Equivalent:CCE)، درصد کربن آلی (Organic Carbon:OC)، جمعیت میکروبی در محیط کشت NA (Microbial population counted in NA: NA)، جمعیت میکروبی در محیط کشت CFMM (Microbial population counted in CFMM: CFMM)، فعالیت آنزیم اوره‌آز (Urease activity:UA)، ** و * به‌ترتیب معنی‌دار در سطوح ۱ و ۵ درصد.



شکل ۳- نمودار واریانس تراکمی و مقادیر ویژه برای ۱۲۰ نمونه خاک از ٤ منطقه نمونه‌برداری

Figure 3- Cumulative and eigenvalues diagram for 120 soil samples from 4 sampling locations

همانطور که در جدول ۶ مشاهده می‌شود هر مؤلفه شامل تعدادی متغیر با ضرایب مختلف (بردارهای ویژه) است و هر متغیری که ضریب بالاتر از ۰/۵ داشته باشد در نظر گرفته‌می‌شود (Cox *et al.*, 2003). در تحلیل PCA برخی از این متغیرها دارای ضریب منفی و برخی دارای ضریب مثبت هستند که علامت منفی نشان‌دهنده رابطه معکوس بین این متغیر با سایر متغیرهای موجود در مؤلفه است و هرچه مقدار این متغیر افزایش یابد، تأثیرپذیری و اختلاف بین نمونه‌های خاک بر اثر آن متغیر کاهش می‌یابد. در حالی‌که علامت مثبت نشان‌دهنده رابطه مستقیم با سایر متغیرهاست به‌عبارت دیگر با افزایش مقدار متغیری که ضریب مثبت دارد، تأثیرپذیری و اختلاف بین نمونه‌های خاک بر اثر آن

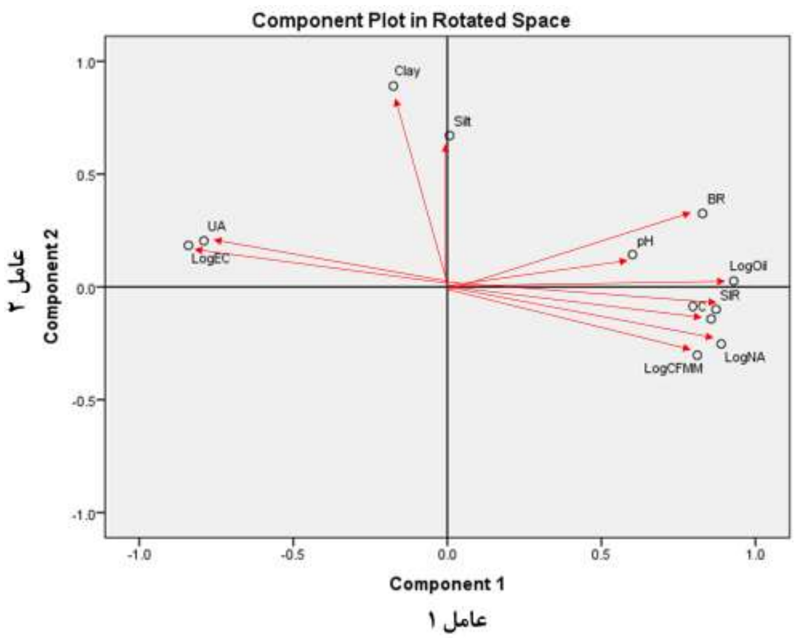
متغیر نیز افزایش می‌یابد. در واقع می‌توان گفت منظور از تأثیرپذیری زیاد، اختلاف بیشتر بین مقادیر متغیرها در خاک‌های مختلف است که بیانگر تفاوت بین مناطق مختلف نمونه‌برداری است (جدول ۷).

بر اساس نتایج به‌دست آمده، درصد نفت (Oil)، تنفس پایه (BR)، تنفس برانگیخته (SIR)، جمعیت میکروبی در محیط کشت NA و CFMM، میزان pH، EC، درصد کربن آلی (OC) و فعالیت اوره‌آز (UA) دارای بالاترین میزان بردار ویژه بودند و بیشترین تأثیر را در مؤلفه اول داشتند که همه این متغیرها به غیر از EC و UA دارای ضرایب مثبت بودند لذا می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش این متغیرها، اختلاف بین نمونه‌های خاک نیز افزایش می‌یابد (جدول ۷). در مؤلفه دوم برخی ویژگی‌های فیزیکی اندازه‌گیری شده همچون درصد رس (Clay) و درصد سیلت (Silt) بالاترین تأثیر را به خود اختصاص دادند (جدول ۷). مؤلفه اول را می‌توان مؤلفه بیوشمیایی نامید زیرا مقادیر بردارهای ویژه پارامترهای بیولوژیکی و شیمیایی بالا بودند و همچنین باتوجه به بالا بودن مقدار بردار ویژه درصد رس و سیلت، می‌توان مؤلفه دوم را مؤلفه فیزیکی نامید. همانطور که مشاهده می‌شود پارامترهای بیوشیمیایی به‌ویژه درصد نفت و جمعیت میکروبی منبع اصلی تنوع در داده‌ها هستند (جدول ۷). آنالیز PCA در پژوهش‌های زیادی در خاک های آلوده به نفت انجام شد که در اغلب آنها درصد نفت قوی‌ترین عامل تعیین‌کننده تنوع بین داده‌ها بود (Nie *et al*., 2009؛ Xiao *et al*., 2016).

جدول ٦- تجزیه به مؤلفه اصلی برای نمونه‌خاک‌های ٤ منطقه نمونه‌برداری

Table 6- PCA analysis for soil samples of 4 sampling locations

مؤلفه‌ها Factors	درصد واریانس تراکمی Cumulative	درصد واریانس Variance (%)
F1	57.63	57.63
F2	71.32	13.69
F3	79.99	8.67
F4	88.71	5.72
F5	90.31	4.60
F6	93.43	3.12
F7	95.86	2.43
F8	97.38	1.51
F9	98.76	1.38
F10	99.40	0.64
F11	100	0.60



شکل ٤- پراکنش پارامترهای مورد بررسی بر اساس دو مولفه اول و دوم در تحلیل مولفه‌های اصلی

Figure 4- Distribution of investigated parameters based on the first and second components in principal components analysis

جدول ۷- مقادیر بردارهای ویژه پارامترهای مورد بررسی در تجزیه مولفه‌های اصلی (PCA)

Table 7- The values of the eigenvectors of the investigated parameters in the analysis of the PCA analysis

متغیرها Parameters	مؤلفه ۱ F1	مؤلفه ۲ F2
غلظت نفت Oil	0.913	0.175
تنفس پایه BR	0.766	0.454
تنفس برانگیخته SIR	0.877	0.042
جمعیت در محیط NA (NA)	0.914	-0.107
جمعیت در محیط CFMM (CFMM)	0.849	-0.169
رس %Clay	-0.316	0.851
سیلت %Silt	-0.100	0.663
pH	0.570	0.238
قابلیت هدایت الکتریکی EC	-0.859	0.047
کربن آلی %OC	0.868	-0.003
فعالیت اوره‌آز UA	-0.813	0.070

همچنین (Klamerus-Iwan *et al*., 2015) اثرات آلودگی نفتی را بر فعالیت آنزیمی و خواص فیزیکی خاک مورد بررسی قرار دادند و در آنالیز مؤلفه‌های اصلی مشاهده کردند که ۷۱ درصد از تغییرات در مطالعه آنها به شدت با فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز و اوره‌آز و جمعیت میکروبی همبستگی داشت. همانطور که در شکل ۴ نیز مشاهده می‌شود، هر چه یک متغیر در نمودار بای‌پلات (Bi-plot)، فاصله بیشتری از مرکز داشته باشد، تأثیرگذاری بیشتری در تنوع داده‌های به‌دست آمده از نمونه‌خاک‌های مختلف خواهدداشت.

نتیجه‌گیری

نتایج آزمایشات صورت گرفته در این پژوهش که مربوط به یک آلودگی نفتی طبیعی و طولانی مدت بود، افزایش جمعیت باکتریایی را با افزایش شدت آلاینده نفتی نشان داد. به‌نظر در گذر زمان انتخاب طبیعی حاکم شده است و گونه‌های مقاوم و سازش یافته بر جمعیت حساس پیشی گرفته است. از طرف دیگر فعالیت اوره‌آز خاک با افزایش غلظت آلاینده روند کاهشی نشان داد و این بر خلاف سازگاری جمعیت میکروبی است، به‌نظر اثر کاهشی را یا می‌توان به اثر بازدارندگی ترکیبات نفتی بر فعالیت این آنزیم، یا به فقدان فعالیت اوره‌آزی در جمعیت غالب و حاکم در این خاکها نسبت داد. نوع آلاینده نفتی، تأثیر مستقیم ترکیبات نفتی بر ریزجانداران مولد اوره‌آز و همچنین منشأ غیرمیکروبی تولیدکننده اوره‌آز می‌توانند از دلایل احتمالی کاهش فعالیت اوره‌آز در خاک‌های آلوده باشند. نتایج آنالیزهای PCA نیز نشان داد که شاخص‌های بیوشیمیایی به‌ویژه درصد نفت، جمعیت میکروبی و فعالیت اوره‌آز، از مؤثرترین عوامل در تفاوت بین نمونه‌ها می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه تبریز، دانشگاه رازی کرمانشاه و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور در انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Andreoni, V., Cavalca, L., Rao, M. A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Dell'Amico, E., ... & Gianfreda, L. (2004). Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere*, *57*(5), 401-412. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.06.013
2. Christopher, S., Hein, P., Marsden, J., & Shurleff, A.S. (1988). Evaluation of methods 3540 (soxhlet) and 3550 (Sonication) for evaluation of appendix IX analyses from solid samples. S-CUBED, Report for EPA contract 68-03-33-75, work assignment No. 03, Document No (pp. 523-546). SSS.
3. Cox, J.F., Blackstone, J.H., & Schleier, J.G. (2003). *Managing operations: A focus on excellence*. North River Press.
4. Deaker, R., Kecskés, M.L., Rose, M.T., Amprayn, K., Ganisan, K., Tran, T.K.C., Vu, T.N., Phan, T.C., Nguyen, T.H., & Kennedy, I.R. (2011). *Practical methods for the quality control of inoculant biofertilisers*. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR). Canberra. 101 pp
5. Dos Santos, H. F., Cury, J.C., Do Carmo, F.L., Dos Santos, A.L., Tiedje, J., van Elsas, J.D., ... & Peixoto, R.S. (2011). Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. *PloS one*, *6*(3), e16943. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016943
6. Ebrahimi, M., Falah, M., & Sarikhani, M.R., (2013). Isolation and identification of some bacteria that decompose petroleum substances from soil contaminated with petroleum substances and checking their growth ability in the presence of gasoline. *Water and Soil Science*, *3*(1), 109-121. (In Persian with English abstract)
7. Gianfreda, L., Rao, M.A., Piotrowska, A., Palumbo, G., & Colombo, C. (2005). Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. *Science of the Total Environment*, *341*(1-3), 265-279. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.10.005
8. Guo, H., Yao, J., Cai, M., Qian, Y., Guo, Y., Richnow, H.H., ... & Ceccanti, B. (2012). Effects of petroleum contamination on soil microbial numbers, metabolic activity and urease activity. *Chemosphere*, *87*(11), 1273-1280. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.034
9. Hui, L.I., Zhang, Y., Kravchenko, I., Hui, X.U., & Zhang, C.G. (2007). Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: a laboratory experiment. *Journal of Environmental Sciences*, *19*(8), 1003-1013. https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60163-6
10. Klamerus-Iwan, A., Błońska, E., Lasota, J., Kalandyk, A., & Waligórski, P. (2015). Influence of oil contamination on physical and biological properties of forest soil after chainsaw use. *Water, Air, & Soil Pollution*, *226*, 1-9. https://doi.org/10.1007/s11270-015-2649-2
11. Labud, V., Garcia, C., & Hernandez, T. (2007). Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*, *66*(10), 1863-1871. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.021
12. Lee, S.H., Oh, B.I., & Kim, J.G. (2008). Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity. *Bioresource Technology*, *99*(7), 2578-2587. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.039
13. Liang, Y., Zhang, X., Zhou, J., & Li, G. (2015). Long-term oil contamination increases deterministic assembly processes in soil microbes. *Ecological Applications*, *25*(5), 1235-1243. https://doi.org/10.1890/14-1672.1
14. Liao, J., Wang, J., Jiang, D., Wang, M.C., & Huang, Y. (2015). Long-term oil contamination causes similar changes in microbial communities of two distinct soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 10299-10310. https://doi.org/10.1007/s00253-015-6880-y
15. Lipińska, A., Kucharski, J., & Wyszkowska, J. (2013). Urease activity in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies*, *22*(5), 1393-1400.
16. Margesin, R., Hämmerle, M., & Tscherko, D. (2007). Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. *Microbial Ecology*, *53*, 259-269. https://doi.org/10.1007/s00248-006-9136-7
17. Martin, A.E., & Reeve, R. (1955). A rapid manometeic method for determining soil carbonate. *Soil Science*, *79*(3), 187-198.
18. Moradi, S. H., Sarikhani, M. R., & Alliasgharzad, N. (2019). Isolation of endophytic bacteria from grasses root and assessing phosphate solubilization, potassium releasing and auxin production abilities of isolated bacteria. *Biological Journal of Microorganism*, *36*(2020), 1-13. https://doi.org/10.22108/bjm.2019.117674.1207
19. Moreno, B., Nogales, R., Macci, C., Masciandaro, G., & Benitez, E. (2011). Microbial eco-physiological profiles to estimate the biological restoration of a trichloroethylene-contaminated soil. *Ecological Indicators* *11*(6), 1563-1571. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.03.026
20. Nie, M., Zhang, X.D., Wang, J.Q., Jiang, L.F., Yang, J., Quan, Z.X., ... & Li, B. (2009). Rhizosphere effects on soil bacterial abundance and diversity in the Yellow River Deltaic ecosystem as influenced by petroleum contamination and soil salinization. *Soil Biology and Biochemistry*, *41*(12), 2535-2542. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.09.012

21. Phillips, L.A., Greer, C.W., Farrell, R.E., & Germida, J.J. (2009). Field-scale assessment of weathered hydrocarbon degradation by mixed and single plant treatments. *Applied Soil Ecology*, *42*(1), 9-17. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.01.002
22. Rao, M.A., Scelza, R., Acevedo, F., Diez, M. C., & Gianfreda, L. (2014). Enzymes as useful tools for environmental purposes. *Chemosphere 107*: 145-162. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.12.059.
23. Rowell, D.L. (1994). *Soil Science: Methods and Applications*. Longman, UK.
24. Saadoun, I., Mohammad, M.J., Hameed, K.M., & Shawaqfah, M.A. (2008). Microbial populations of crude oil spill polluted soils at the Jordan-Iraq desert (the Badia region). *Brazilian Journal of Microbiology*, *39*, 453-456.
25. Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., & Margesin, R. (Eds.). (2012). *Methods in soil biology*. Springer Science & Business Media.
26. Sutton, N.B., Maphosa, F., Morillo, J.A., Abu Al-Soud, W., Langenhoff, A.A., Grotenhuis, T., Rijnaarts, H.H., & Smidt, H. (2013). Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(2): 619–630. https://doi.org/10.1128/AEM.02747-12
27. Tabatabai, M.A. (1994). Soil enzymes. Methods of soil analysis: Part 2 Microbiological and biochemical properties, 5, 775-833. https://doi.org/10.2136/sssabookser5.2.c37
28. Trasar-Cepeda, C., Leiros, M.C., Seoane, S., & Gil-Sotres, F. (2000). Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology and Biochemistry*, *32*(13), 1867-1875. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00160-7
29. Vincent, A.O., Felix, E., Weltime, M.O., Ize-iyamu, O.K., & Daniel, E.E. (2011). Microbial degradation and its kinetics on crude oil polluted soil. *Research Journal of Chemical Sciences*.
30. Wyszkowska, J., Kucharski, M., & Kucharski, J. (2006). Application of the activity of soil enzymes in the evaluation of soil contamination by Diesel oil. *Polish Journal of Environmental Studies*, *15*(3), 501-506.
31. Xiao, K.Q., Li, L.G., Ma, L.P., Zhang, S.Y., Bao, P., Zhang, T., & Zhu, Y.G. (2016). Metagenomic analysis revealed highly diverse microbial arsenic metabolism genes in paddy soils with low-arsenic contents. *Environmental Pollution*, *211*, 1-8. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.023
32. Xu, J.G., & Johnson, R.L. (1995). Root growth, microbial activity and phosphatase activity in oil-contaminated, remediated and uncontaminated soils planted to barley and field pea. *Plant and Soil*, *173*(1), 3-10. https://doi.org/10.1007/BF00155512